

DESLIGNIFICAÇÃO DO BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR VISANDO A PRODUÇÃO DE ETANOL CELULÓSICO

G. F. MELLO¹, R. F. T. MENDES¹, D. D. V. SILVA¹ e K. J. DUSSÁN¹

¹ Instituto de Química, UNESP - Univ Estadual Paulista, Campus Araraquara, Departamento de Bioquímica e Tecnologia Química

E-mail para contato: kelly.medina@iq.unesp.br

RESUMO – A produção de etanol celulósico (2G), obtido de biomassas vegetais, ainda apresenta desafios tecnológicos para que se torne competitiva ao etanol obtido do caldo de cana (1G). Estes vão desde a etapa de despolimerização da parede vegetal para solubilização dos açúcares das frações C6 e C5, com mínima liberação de compostos tóxicos, até a disponibilidade de micro-organismos capazes de fermentar estes açúcares, quesitos estes primordiais para o sucesso da tecnologia de obtenção de etanol a partir do bagaço de cana-de-açúcar. Para tanto se faz necessário o uso de pré-tratamentos químicos e enzimáticos (enzimas de baixo custo para hidrolisar a fração celulósica) no processamento do bagaço para a obtenção de açúcares solúveis a partir da matriz de celulignina que serão utilizados na posterior conversão em etanol por processos fermentativos. O uso da etapa de deslignificação do bagaço pré-tratado é de grande interesse para a obtenção de glicose pela ação das enzimas devido à maior disponibilidade da celulose. Portanto, o objetivo deste trabalho foi otimizar as condições operacionais da etapa de tratamento alcalino do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado, utilizando hidróxido de sódio, para se obter uma biomassa com maior conteúdo de celulose. Os resultados mostraram que a deslignificação foi mais eficiente quando foram empregados 2,2 % (p/v) de NaOH durante 100 min. a 110 °C, obtendo-se um material com 85 % de celulose.

1. INTRODUÇÃO

Nos últimos anos pesquisadores de diferentes setores da academia e indústria têm despendido esforços para desenvolver tecnologias que aumentem a eficiência e a sustentabilidade (econômica e ambiental) do processo de obtenção de etanol proveniente de materiais lignocelulósicos, denominado de segunda geração (2G) ou etanol celulósico. Estas pesquisas são baseadas no desenvolvimento de processos de obtenção de bioetanol a partir de uma diversidade de biomassas vegetais, mas principalmente a partir do bagaço de cana-de-açúcar em virtude de sua grande quantidade no setor sucroalcooleiro apesar de seu usual aproveitamento para cogeração de energia (Balat, 2011; Cardona *et al.*, 2010; Quintero *et al.*, 2011). Além disso, fica cada vez mais claro que para viabilizar a produção de etanol celulósico é imprescindível acoplá-la às tecnologias já estabelecidas dos processos das usinas de primeira geração. Mesmo considerando os avanços nas pesquisas ao longo dos anos, há ainda barreiras a serem vencidas como a desconstrução da matriz lignocelulósica, de forma a disponibilizar seus açúcares monoméricos com a mínima liberação e/ou formação de compostos tóxicos aos micro-organismos e a disponibilidade de micro-organismos capazes de

fermentar tanto açúcares C6 (glicose) quanto C5 (xilose e arabinose), ou seja, os principais carboidratos constituintes das frações de celulose e hemicelulose das paredes vegetais.

A conversão de materiais lignocelulósicos em bioetanol requer etapa de pré-tratamento como uma das operações unitárias fundamentais, devido à estreita associação que existe entre os três principais componentes da parede celular vegetal (celulose, hemicelulose e lignina) (Gámez *et al.*, 2006). Portanto, o papel principal desta etapa é diminuir a interação entre os principais componentes da parede celular e torná-los susceptíveis aos processos de sacarificação e fermentação (Brethauer & Wyman, 2010; Gámez *et al.*, 2006). As melhores condições de pré-tratamento devem ser definidas como aquelas em que há recuperação máxima dos açúcares solúveis em água, a partir da hemicelulose (hidrolisado hemicelulósico), juntamente com a produção do melhor substrato possível (celulignina) para seu posterior aproveitamento. Um dos pré-tratamentos mais utilizados tem sido com ácido sulfúrico diluído, principalmente em função da sua eficiência no processo de separação dos componentes da parede celular (Canilha *et al.*, 2010; Dussán *et al.*, 2016). Numa segunda etapa, para a disponibilização da celulose presente na celulignina, estudos têm demonstrado a necessidade de uma etapa de deslignificação a qual tem sido realizada empregando-se hidróxido de sódio como catalisador. A celulose resultante nesta etapa tem sido submetida a processos de hidrólise enzimática ou ácida para a solubilização da glicose (hidrolisado celulósico) (Dias *et al.*, 2009). A hidrólise enzimática tem sido mais indicada para a conversão da celulose em monossacarídeos após o pré-tratamento do bagaço, uma vez que constitui uma etapa simplificada no processo e requer condições mais brandas, além de apresentar maior especificidade pelo substrato (celulose) (Ferreira *et al.*, 2009). O uso de enzimas celulolíticas na hidrólise da polpa lignocelulósica vem sendo extensivamente estudado para a liberação de açúcares fermentescíveis da matriz de celulignina (Dekker *et al.*, 1987).

Dentro deste contexto, o objetivo deste trabalho foi otimizar as condições operacionais da etapa de tratamento alcalino do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado (celulignina) utilizando hidróxido de sódio, a fim de se obter uma biomassa com maior conteúdo de celulose, que proporcionará aumento do rendimento da hidrólise enzimática e consequentemente favorecerá a produção de etanol celulósico.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar

O bagaço de cana-de-açúcar foi caracterizado e submetido à hidrólise ácida (pré-tratamento) em autoclave utilizando Erlenmeyer com capacidade volumétrica de 5 litros. A hidrólise foi realizada empregando-se 2 % (p/v) de ácido sulfúrico para uma relação sólido-líquido de 1:10, temperatura de 121 °C por 71 minutos (Télliez-Luis *et al.*, 2002). O hidrolisado hemicelulósico obtido, após ser filtrado para separação da massa sólida (celulignina), foi armazenado em câmara fria a 4 °C para posterior caracterização quanto aos teores de açúcares e compostos tóxicos. A celulignina resultante dessa etapa foi lavada com água para remoção do ácido residual, seca ao sol até umidade em torno de 10 % e armazenada a temperatura ambiente para posterior processo de deslignificação.

2.2. Deslignificação do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado

O sólido resultante da etapa de pré-tratamento (celulignina) foi submetido a um processo de deslignificação alcalina, em autoclave utilizando Erlenmeyer com capacidade de 1000 mL, com uma relação sólido-líquido de 1:20, a uma temperatura de 110 °C (Dussán *et al.*, 2014), avaliando-se a concentração de NaOH (0,5 – 2,5 %p/v) e o tempo de reação (20 – 100 min) de acordo com planejamento fatorial completo 2²-face centrada. A fração sólida obtida (celulose) foi lavada com água destilada para remoção da lignina extraída até pH neutro. Após este procedimento, a fração celulósica foi submetida à secagem em temperatura ambiente e caracterizada quanto a seu teor de celulose, hemicelulose e lignina.

2.3. Caracterização química

O bagaço de cana-de-açúcar “in natura” e após hidrólises foi caracterizado quanto aos seus teores de celulose, hemicelulose, lignina, cinzas e extrativos, de acordo com metodologia padrão de caracterização de carboidratos e lignina estruturais de biomassa, do National Renewable Energy Laboratory – NREL (Sluiter *et al.*, 2012).

2.4. Métodos Analíticos

As concentrações de glicose, xilose, arabinose e ácido acético foram determinadas por cromatografia líquida de alta eficiência em cromatógrafo Shimadzu LC-30AD. As amostras foram previamente filtradas em filtro Sep Pak C18 e injetadas no cromatógrafo, utilizando-se as seguintes condições: coluna BIO-RAD AMINEX HPX-87H (300 X 7,8 mm) mantida à temperatura de 85 °C; volume de injeção de 20 µL; detector de índice de refração; fase móvel ácido sulfúrico 0,01 N e fluxo de 0,6 mL/min.

2.5. Análise da Estatística

Os resultados dos ensaios realizados com base no planejamento fatorial completo com face centrada foram analisados estatisticamente, utilizando-se o programa STATISTICA versão 10.0, para a verificação dos efeitos individuais e de interação das variáveis sobre a resposta, definição das variáveis importantes para o processo, avaliação dos erros experimentais e para a modelagem empírica dos resultados em função das variáveis escolhidas.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A caracterização química do bagaço de cana de açúcar “in natura” e da celulignina resultante do pré-tratamento estão apresentados na Tabela 1. Observa-se que a quantidade de celulose e lignina do bagaço de cana após a hidrólise ácida aumentou devido à solubilização dos açúcares constituintes da hemicelulose (xilose, glicose e arabinose). Isto indica que as condições de hidrólise empregadas foram apropriadas para extrair os açúcares contidos na fração hemicelulósica. Como também pode ser observado na Tabela 1, no bagaço “in natura” a fração hemicelulósica representou 21,83 %, enquanto a celulose correspondeu à 32,49 % da sua composição. Estes valores apresentam algumas diferenças quando comparados aos resultados obtidos por Dussán *et al.* (2016) os quais obtiveram 34,6 % celulose, 18,9 %

hemicelulose, 27,6 % lignina, 8,8 % extrativos e 6,4 % de cinzas. Estas diferenças podem ser atribuídas às características da matéria-prima, como variedade, idade, condições de cultivo e tempo de estocagem. Os níveis de concentração de hidróxido de sódio, tempo de deslignificação e a respostas, conteúdo de celulose e lignina, estão apresentados na Tabela 2 e demonstram que a etapa de deslignificação foi capaz de aumentar a quantidade de celulose do material lignocelulósico quando comparado com o material após pré-tratamento com ácido diluído (celulignina), em todas as condições estudadas.

Tabela 1 – Caracterização química do bagaço de cana de açúcar “in natura” e celulignina

Componentes	Bagaço “in natura”	Celulignina
Celulose (%)	32,49 ± 1,66	47,45 ± 1,30
Hemicelulose (%)	21,83 ± 0,68	13,37 ± 0,85
Lignina total (%)	27,80 ± 1,30	34,63 ± 0,84
Acetil (%)	2,87 ± 0,49	0,54 ± 0,08
Extrativos (%)	15,40 ± 0,64	-
Cinzas (%)	5,17 ± 0,32	3,05 ± 0,04
Total (%)	105,5 ± 1,05	99,05 ± 0,39

Tabela 2 – Matriz do planejamento fatorial 2²- face centrada com três repetições no ponto central para estudo da influência das variáveis: concentração de NaOH e tempo de reação na etapa de deslignificação do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado com ácido diluído. Níveis codificados em parêntesis.

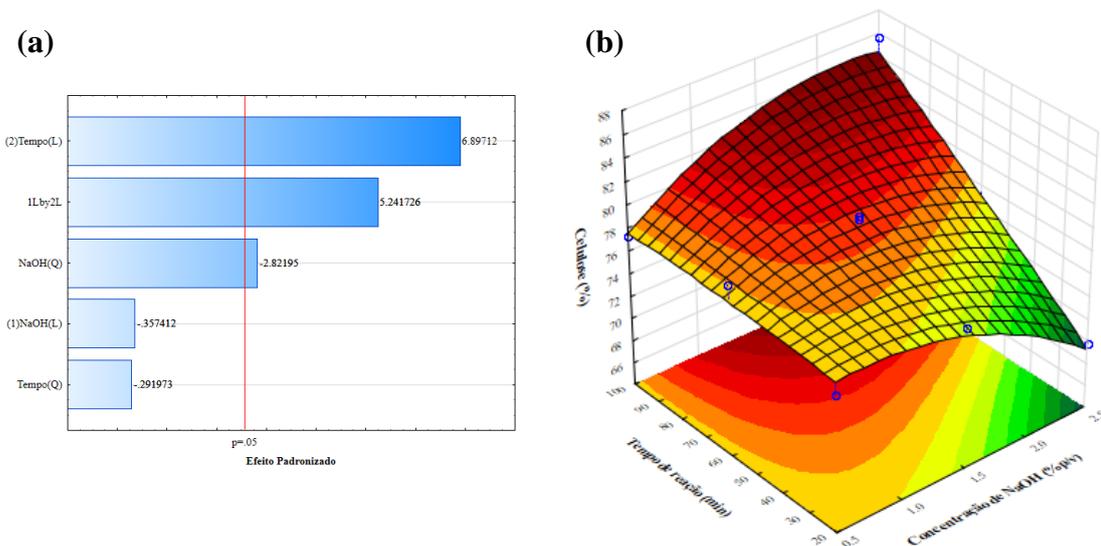
Experimentos	Concentração NaOH (%p/v)	Tempo de reação (min)	Celulose (%)
1	0,5 (-1)	20 (-1)	75,87 ± 0,45
2	2,5 (+1)	20(-1)	69,73 ± 1,09
3	0,5 (-1)	100 (+1)	77,27 ± 1,42
4	2,5 (+1)	100 (+1)	85,72 ± 2,27
5 (FC)	1,5 (0)	20 (-1)	76,38 ± 0,54
6 (FC)	1,5 (0)	100 (+1)	82,49 ± 0,83
7 (FC)	0,5 (-1)	60 (0)	78,99 ± 0,43
8 (FC)	2,5 (+1)	60 (0)	75,46 ± 2,21
9 (PC)	1,5 (0)	60 (0)	79,95 ± 1,47
10 (PC)	1,5 (0)	60 (0)	80,00 ± 2,39
11 (PC)	1,5 (0)	60 (0)	79,72 ± 0,68

FC = face centrada; PC = ponto central.

Os maiores valores de porcentagem de celulose no material após deslignificação, 82 e 85 %, foram observados nos experimentos 4 e 6 com concentração de NaOH de 2,5 e 1,5 % (p/v), respectivamente, e tempo de reação de 100 min. Entretanto quando foi empregado 2,5 % (p/v) de NaOH com um tempo de reação de 20 min houve um decréscimo na porcentagem de celulose de 1,23 vezes, mostrando assim que o tempo de reação influenciou significativamente na eficiência do processo de deslignificação. A influência das variáveis concentração de NaOH e tempo de reação na deslignificação do bagaço pré-tratado sobre o conteúdo de celulose e lignina no material foi estudada de maneira mais detalhada, utilizando-se a metodologia estatística apresentada a seguir. No gráfico de Pareto (Figura 1a), é apresentada a análise da estimativa dos efeitos para o parâmetro porcentagem de celulose no material após deslignificação, tendo sido considerados significativos os termos cujos valores de p fossem menores ou iguais a 0,05 (representado pela linha contínua do gráfico). Além disso, observou-

se que as variáveis Tempo de reação-L (2), concentração de NaOH-Q (1) e a interação 1(L)-2(L) apresentaram efeitos significativos. Considerando a ordem decrescente de importância das variáveis e suas interações, o efeito da variável tempo de reação teve maior influência sobre a resposta porcentagem de celulose.

Figura 1 – (a) Estimativa dos efeitos (ao nível de 95 % de confiança) através do gráfico de Pareto de acordo o planejamento fatorial 2²- face centrada; (b) Superfície de resposta que relaciona a porcentagem de celulose no material com a concentração de NaOH e tempo de reação



Pela análise de variância da regressão do modelo (ANOVA, dados não apresentados) verificou-se que a resposta porcentagem de celulose apresentou coeficiente de correlação (R^2) superior a 0,94. Observa-se também que, para a resposta porcentagem de celulose, o modelo proposto foi significativo, não apresentando falta de ajuste ao nível de significância de 0,05 (95 % de confiança), o que o valida, possibilitando representá-lo por meio de uma superfície de resposta. Com base nos resultados obtidos com a análise de variância, o modelo matemático, com as variáveis reais, para descrever a resposta, dentro da região estudada, pode ser apresentado na forma da Equação 1, a qual possibilita a obtenção da superfície de resposta (Figura 1b). Onde X_1 é a concentração de NaOH (% p/v) e X_2 é o tempo de reação (min).

$$\% \text{ Celulose} = 76,32 + 1,73 X_1 - 2,47 X_1^2 - 0,02 X_2 - 0,0002 X_2^2 + 0,09 X_1 X_2 \quad (1)$$

Na Figura 1b está apresentada, através de superfície de resposta, a relação entre a variável dependente porcentagem de celulose e as variáveis independentes concentração de NaOH e tempo de reação. A maior porcentagem de celulose estimada, cerca de 84 %, foi prevista para os níveis +1 e +1 de tempo de reação e concentração de NaOH, respectivamente, correspondente a 100 min e 2,5 % (p/v) de concentração de NaOH. Finalmente, a Equação 1 foi otimizada utilizando a função de desejabilidade (FD) do programa STATISTICA, o qual estima a melhor combinação dos fatores (considerando todos os efeitos do modelo) que resulta na melhor combinação possível da resposta. Portanto, foi encontrando um valor ótimo de porcentagem de celulose no material de 84,67 % nas condições de 2,17 % (p/v) de

concentração de NaOH e um tempo de reação de 100 min a uma temperatura de 110 °C. Estes resultados apresentam uma diferença significativa quando comparados com os resultados reportados por Giese *et al.* (2013) os quais realizaram o processo de deslignificação a 100 °C utilizando bagaço de cana pré-tratado com ácido sulfúrico diluído e 1 % (p/v) de NaOH por um tempo de 1 h e reportaram uma porcentagem de celulose de 53,06 %, confirmando a importância de otimizar as variáveis operacionais da etapa de deslignificação.

6. CONCLUSÕES

O estudo das variáveis concentração de NaOH e tempo de reação no processo de deslignificação do bagaço de cana-de-açúcar permitiram aumentar a quantidade de celulose no material lignocelulósico. Além disso, pela análise da estatística foi possível identificar que a variável tempo de reação teve maior influência sobre a resposta porcentagem de celulose.

7. AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem pelo auxílio financeiro à Pró-reitora de Pesquisa da UNESP-PROPe (Edital 009/2016 Primeiros Projetos) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico-CNPq (PIBIC Ensino Médio, Edital 14/2016).

8. REFERÊNCIAS

- BALAT, M. Production of bioethanol from lignocellulosic materials via the biochemical pathway: A review. *Energ Convers Manage*, v. 52(2), p. 858-875, 2011.
- BRETHAUER, S.; WYMAN, C.E. Review: Continuous hydrolysis and fermentation for cellulosic ethanol production. *Bioresource Technol*, v. 101(13), p. 4862-4874, 2010.
- CANILHA, L., CARVALHO, W., DE ALMEIDA FELIPE, M.d.G., DE ALMEIDA E SILVA, J.B.; GIULIETTI, M. Ethanol Production from Sugarcane Bagasse Hydrolysate Using *Pichia stipitidis*. *Appl Biochem Biotech*, v. 161(1), p. 84-92, 2010.
- CARDONA, C.A., QUINTERO, J.A.; PAZ, I.C. Production of bioethanol from sugarcane bagasse: Status and perspectives. *Bioresource Technol*, v. 101(13), p. 4754-4766, 2010.
- DEKKER, R.F.H., KARAGEORGE, H.; WALLIS, A.F.A. Pretreatment Of Hardwood (*Eucalyptus Regnans*) Sawdust By Autohydrolysis Explosion And Its Saccharification By Trichoderma Cellulases. *Biocatalysis*, v. 1(1), p. 47-61, 1987.
- DIAS, M.O.S., ENSINAS, A.V., NEBRA, S.A., MACIEL FILHO, R., ROSSELL, C.E.V.; MACIEL, M.R.W. Production of bioethanol and other bio-based materials from sugarcane bagasse: Integration to conventional bioethanol production process. *Chem Eng Res Des*, v. 87(9), p. 1206-1216, 2009.
- DUSSÁN, K.J., SILVA, D.D.V., MORAES, E.J.C., ARRUDA, P.V.; FELIPE, M.G.A. Dilute-acid hydrolysis of cellulose to glucose from sugarcane bagasse. *Chem Engineer Trans*, v. 38, p. 433-438, 2014.
- DUSSÁN, K.J., SILVA, D.D.V., PEREZ, V.H.; DA SILVA, S.S. Evaluation of oxygen availability on ethanol production from sugarcane bagasse hydrolysate in a batch bioreactor using two strains of xylose-fermenting yeast. *Renew Energ*, v. 87, p. 703-710, 2016.
- FERREIRA, S., DUARTE, A.P., RIBEIRO, M.H.L., QUEIROZ, J.A.; DOMINGUES, F.C. Response surface optimization of enzymatic hydrolysis of *Cistus ladanifer* and *Cytisus striatus* for bioethanol production. *Biochem Eng J*, v. 45(3), p. 192-200, 2009.
- GÁMEZ, S., GONZÁLEZ-CABRIALES, J.J., RAMÍREZ, J.A., GARROTE, G.; VÁZQUEZ, M. Study of the hydrolysis of sugar cane bagasse using phosphoric acid. *J Food Eng*, v. 74(1), p. 78-88, 2006.
- GIESE, E.C., PIEROZZI, M., DUSSÁN, K.J., CHANDEL, A.K.; DA SILVA, S.S. Enzymatic saccharification of acid-alkali pretreated sugarcane bagasse using commercial enzyme preparations. *J Chem Technol Biot*, v. 88(7), p. 1266-1272, 2013.
- QUINTERO, J.A., RINCÓN, L.E.; CARDONA, C.A. Chapter 11 - Production of Bioethanol from Agroindustrial Residues as Feedstocks A2 - Pandey, Ashok. in: *Biofuels*, (Eds.) C. Larroche, S.C. Ricke, C.-G. Dussap, E. Gnansounou, Academic Press. Amsterdam, p. 251-285, 2011.
- SLUITER, A., HAMES, B., RUIZ, R., SCARLATA, C., SLUITER, J., TEMPLETON, D.; CROCKER, D. Determination of Structural Carbohydrates and Lignin in Biomass. in: *Laboratory Analytical Procedure (LAP)*, National Renewable Energy Laboratory (NREL). Golden, Colorado, p. 18, 2012.
- TÉLLEZ-LUIS, S.J., RAMÍREZ, J.A.; VÁZQUEZ, M. Mathematical modelling of hemicellulosic sugar production from sorghum straw. *J Food Eng*, v. 52(3), p. 285-291, 2002.